

Visualization of detailed structures
containing cholinesterases in intestine by a
sensitive histochemical method

著者	齊藤 康晴
発行年	1990-03-24
その他の言語のタイトル	高感度組織化学法によるラット腸管のコリンエステラーゼ微細構造について コウカンド ソシキ カガクハウ ニ ヨル ラット チョウカン ノ コリン エステラーゼ ビサイ コウゾウ ニ ツイテ
URL	http://hdl.handle.net/10422/1759

氏名・（本籍） 齊 藤 康 晴 （静岡県）
学 位 の 種 類 医学博士
学 位 記 番 号 論医博第 61 号
学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当
学位授与年月日 平成 2 年 3 月 24 日
学 位 論 文 題 目 VISUALIZATION OF DETAILED STRUCTURES CONTAINING
CHOLINESTERASES IN INTESTINE BY A SENSITIVE
HISTOCHEMICAL METHOD
(高感度組織化学法によるラット腸管のコリンエステラーゼ微細構
造について)

審 査 委 員 主査 教授 前 田 敏 博
副査 教授 細 田 四 郎
副査 教授 越 智 淳 三

論 文 内 容 要 旨

〔目 的〕

末梢神経系においては、コリン作動性神経（コリン神経）を同定する目的で Acetylcholinesterase (AChE) 組織化学法が非常に幅広く使われている。なぜなら、コリン神経の最も良い指標とされる Choline acetyltransferase (CAT) に比べてより安定で、かつ検出しやすいからである。しかし中枢神経系において、AChE はコリン神経の特異的な指標にはならないと考えられている。従って、末梢神経系においても AChE の特異性に関して、より繊細な検討が必要と考えられる。しかしながら、これまでのところ末梢神経系、なかでも腸管神経系においてはこれらの点に関する検討は全くなされていない。そこで、我々は新しく開発された高感度 AChE 酵素組織化学法によりラット腸管神経系を光顕、及び電顕的に微細局在に関して調べた。

〔方 法〕

ChE 組織化学には、深麻酔下に行き大静脈より脱血、灌流固定した。組織を 8 時間以上後固定した後、15% しょ糖に 48 時間以上浸した。cryostat で 20 μ m の切片を作製した。

5 μ M $K_3Fe(CN)_6$ 、30 μ M $CuSO_4$ 、50 μ M Sodium Citrate に 30 分間、そして 18 μ M のヨー化アセチルチオコリンを含む同液に 1 時間切片を反応させた。0.04% ジアミノベンチジン塩酸塩 (DAB) ・ 0.3% 硫酸ニッケルアンモニウム ・ 0.006% H_2O_2 にて可視化させた。

電顕用にはオスニウム酸で固定し、脱水後、エポンに封入した。

〔結 果〕

反応産物は神経成分と非神経成分の2ヶ所に認められた。神経成分は筋間神経叢、粘膜下神経叢の神経細胞体および神経線維が強く染色された。各神経叢の細胞体はその反応に強弱の差はあったがほとんど全ての細胞体が陽性であった。非神経成分としては絨毛と陰窩の浅層の円柱上皮と外縦走筋層に認められ、内輪走筋層には認められなかった。AChEとBChEの阻害剤を使用することにより神経成分にある反応産物はAChEで、非神経成分のものはBChEと確認された。

電顕的観察にて筋間、粘膜下の神経叢のほとんど全ての神経線維や細胞体がAChE陽性に染色された。BChE陽性反応は、外縦走筋層の平滑筋細胞の間の intercellular clefts にあり、内輪走筋層は反応陰性であった。また少数の平滑筋の細胞体の sarcoplasmic reticulum と nucleolemma の cisternae に陽性構造があった。

このように豊富なAChE陽性神経線維には交感神経線維の節後線維も含まれると思われる。この可能性を確かめるために腸間膜神経節の同一切片においてカテコールアミン (CA) 蛍光組織化学とAChE組織化学を組み合わせで行った。CA蛍光をもつ全ての細胞はAChE活性をもっていた。

〔考 察〕

この新しい方法は中枢のみならず末梢神経系においてもAChEの描出に関して細胞体、線維両方において高感度で安定していることが証明された。

末梢神経系においては、AChE陽性神経はコリン神経系としばしばみなされている。我々の結果はこのような関連を明らかに否定している。なぜなら筋間および粘膜下神経叢の大多数の神経細胞体が陽性に染色されているからである。また腸管神経節の交感系のアルミ神経もAChE陽性であった。AChE陽性の電子密度の高い反応産物はmembrane-lined channels systemに局在した。endoplasmic reticulumで合成された酵素が同部位で貯留し、Golgi apparatusに輸送されそして細胞外にでることを強く示唆する。AChEは可溶性のものと膜結合型の粒子型のものにわけられる。我々の観察した反応産物は後者の型と思われる。axolemmaには強いAChE活性が認められるのに、axoplasmには決して反応産物は認められなかった。それは細胞膜のextra-channel systemに参与して軸索膜の外表にそってこの酵素が輸送されることを意味する。腸管壁には強いBChE活性が認められた。けれども腸管壁におけるBChEの正確な局在と生理的役割に関してほとんどわかっていない。平滑筋のBChE活性がcholinergic transmission (多分、受容体機能に関連すると思われる) に関与することが推測される。

〔結 論〕

1) 末梢神経系においてもAChEはコリン作動性神経の信頼できる指標ではなく、モノアミン神

経系にも共存し、大多数の神経系に存在する。

- 2) AChEの膜結合型は membrane-lined channels system に局在し、軸索膜の外表にそって輸送されると思われる。
- 3) BChEは外縦走筋層の平滑筋細胞の intercellular clefts に局在し、一部の平滑筋細胞の sarcoplasmic reticulum と nucleolemma の cisternae にも認められた。しかし、内輪走筋層には BChE陽性構造は光顕的、電顕的に全く観察することはできなかった。

学位論文審査の結果の要旨

アセチルコリンの分解酵素であるアセチルコリンエステラーゼ (AChE) の組織化学的証明方法は、方法が改良され鋭敏になるに従い、本酵素の活性はコリン作動性神経系にとどまらずより広い分布を示すことが知られてきた。一方腸管の神経系は非常に高い独立性を示し、特異な神経系を形成していることが明らかとなりつつある。

著者はこの複雑なニューロン構成をなす腸管神経系に対し、最も高感度な AChE の組織化学染色法を適用し、多種ニューロンと本酵素活性の関係を調べ、同時に本酵素活性の細胞内局在を観察し、本酵素の合成、輸送様式をも検討した。

その結果、本酵素活性は腸管に於てはコリン作動性と思われる神経細胞体および線維、終末の他に、アミンニューロン、ペプチドニューロンなど殆どの神経系に検出された。とくに腹腔上腸間膜動脈神経節に於ける細胞体で、ノルアドレナリンを大量に含有するものが強い本酵素活性を示す事を見出した。このことは一般的交感神経節とは全く異なり、腸管神経系の特異性を強く示唆している。また本酵素の細胞内局在の観察から、本酵素は当該神経細胞体で作られ膜結合型として軸索膜の外表にそって輸送されるものと考えられた。

他方腸管内の受容側の細胞の一つである腸管外層平滑筋細胞、粘膜上皮細胞にもアセチルコリンを加水分解する酵素が証明されたが、これは神経系と異なり特異的 AChE ではなくブチルコリンをも基質とし得る酵素であった。さらに電顕的観察により、平滑筋細胞自身が合成し細胞膜外面に放出していることが示唆された。これは神経系由来の AChE に依存しない別の系をなしていることを意味し、これまた腸管系の特異性の一つと考えられる。

以上、本研究はコリンエステラーゼの詳細な組織化学により腸管神経系の特異性、独立性の一面を強く示したもので、今後の腸管神経系の種々の研究に寄与するところ大であり、学位論文として価値あるものと認める。